

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan April – Juni 2017 di Laboratorium Sintesis, Laboratorium Sediaan Formulasi, Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Kimia Terpadu II Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

#### **4.2 Alat Penelitian**

##### **4.2.1 Pembuatan Serbuk Simplisia**

1. Mesin penggiling
2. Pengayak mesh 20 dan 40
3. Timbangan analitik balance *Scout Pro 400 g*
4. Oven BINDER

##### **4.2.2 Proses Ekstraksi**

1. Timbangan analitik balance
2. Gelas ukur
3. Gelas piala 1000 ml *Pyrex Iwaki TE\_32*
4. Cawan Porselen Ø 10 cm
5. Penyaring Buchner 100 mm
6. Batang pengaduk
7. Oven BINDER
8. Pipet tetes
9. Stopwatch
10. Sudip besi 20 cm
11. Erlenmeyer 1000 ml
12. *Rotary evaporator vacuum*
13. Mesin pengaduk
14. Deksikator

##### **4.2.3 Identifikasi Profil KLT**

1. Cawan porselen
2. *Chamber*
3. Lampeng KLT

4. Penyemprot noda
5. Pinset
6. Pipa kapiler 5 $\mu$ l
7. Sinar UV
8. Timbangan analitik balance

#### **4.2.4 Pengujian Difusi Cakram**

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. *Incubator*
2. *Autoclave*
3. Mikro pipet
4. *Laminar Air Flow*
5. Tabung reaksi
6. *Hot plate*
7. Bunsen
8. Pipet *volume*
9. Kertas saring
10. *Chamber*
11. Cawan petri
12. Plat KLT
13. Jarum *ose*

#### **4.3 Bahan Penelitian**

##### **4.3.1 Bahan Uji**

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga pacar air (*Impatiens Balsamina L*) yang didapatkan dari pasar Trenggana, Kelurahan Penatih, Kota Denpasar, Bali dan telah diidentifikasi oleh UPT. Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan, Jawa Timur. Penelitian ini mengambil sampel bunga pacar air dengan warna ungu. Mikroba uji adalah *Escherichia coli* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Muhammadiyah Malang.

##### **4.3.2 Proses Ekstraksi**

Pelarut n-heksan teknis.

### 4.3.3 Pengujian Difusi Cakram

1. *Mueller Hinton Agar* (MHA)
2. Aquades steril
3. Bakteri *Escherichia Coli*
4. Kloramfenikol 30 µg sebagai kontrol positif
5. Tween 80

### 4.3.4 Identifikasi Profil KLT

1. N-Heksana teknis
2. Asam sulfat 10%
3. Larutan KOH 10%
4. FeCl<sub>3</sub> 1%
5. Reagen *Dragendorff*
6. Reagen anisaldehyda-asam sulfat
7. Lempeng KLT silika gel 60 F254

### 4.3.5 Sampel Bakteri

Bakteri *Escherichia coli* diisolasi pada media *Mueller Hinton Agar*(MHA) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

## 4.4 Variabel Penelitian

### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi fraksi n-heksan bunga *Impatiens balsamina L.* yang digunakan pada pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram yaitu: 1,25 %, 2,5 %, dan 5 % .

### 4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji yang ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar senyawa uji yang ada pada media agar sebagai parameter untuk menentukan hambat minimum senyawa dari n-heksan.

## 4.5 Penyiapan Sterilisasi Alat dan Bahan

Cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, penjepit, spatula, *Mueller Hinton Agar* (MHA), aquadest, dan seluruh alat serta bahan lain yang akan digunakan disterilisasi di autoklaf pada suhu 121° C selama 15 - 20 menit.

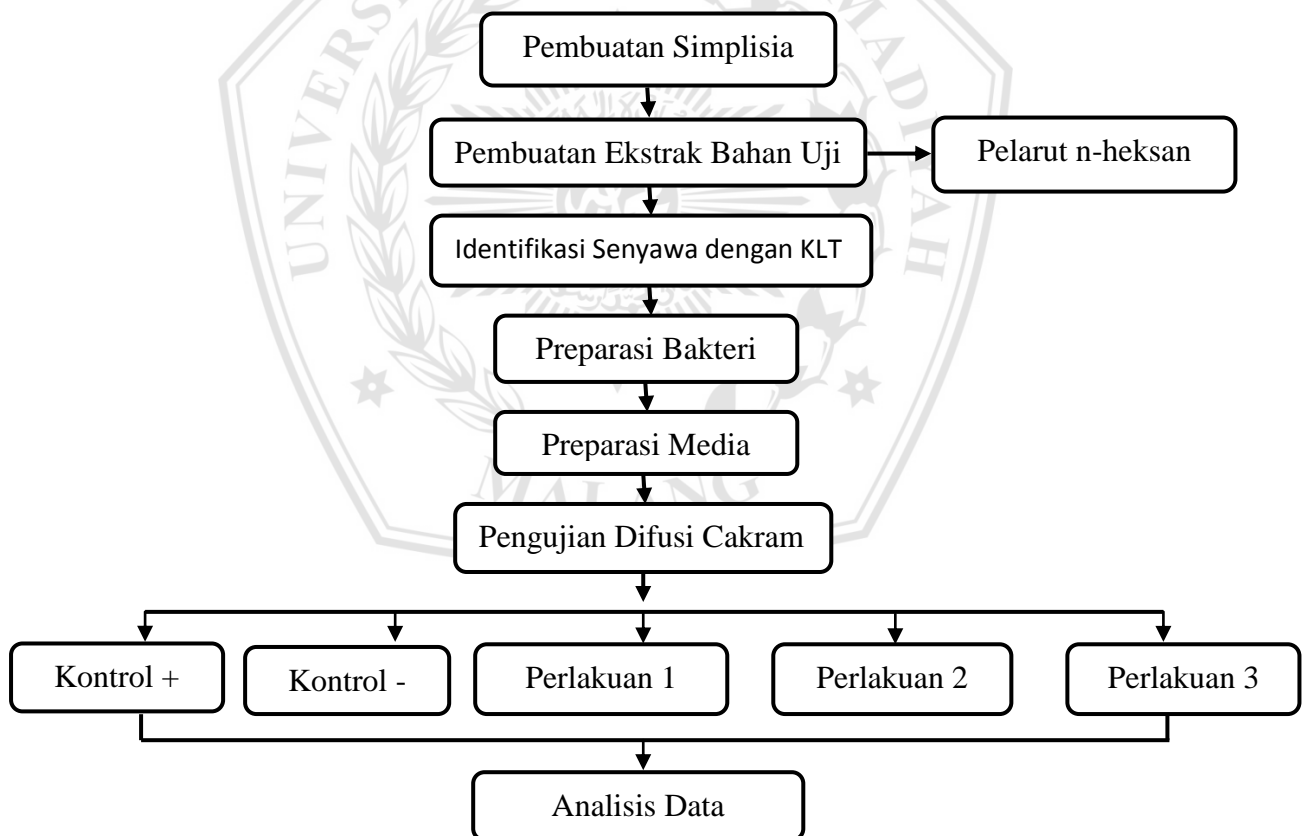
## 4.6 Metode Penelitian

### 4.6.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat serta mengidentifikasi golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri fraksi n-heksan bunga *Impatiens balsamina* L dengan metode difusi cakram. Fraksi n-heksan yang digunakan yaitu 1,25 %, 2,5 % dan 5 %. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua perlakuan yakni kelompok uji dan kelompok kontrol. Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu:

1. Persiapan simplisia
2. Penarikan komponen senyawa/fraksinasi
3. Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT
4. Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram

### 4.6.2 Kerangka Operasional



Keterangan :

Kontrol + : Kloramfenikol 30 µg

Kontrol - : Aquadest + Tween 80

Perlakuan 1 : Konsentrasi Bahan Uji 1,25 %

Perlakuan 2 : Konsentrasi Bahan Uji 2,5 %

Perlakuan 3 : Konsentrasi Bahan Uji 5 %

#### **Bagan 4. 1. Kerangka Operasional**

### **4.6.3 Prosedur Kerja**

#### **4.6.3.1 Pembuatan Simplisia**

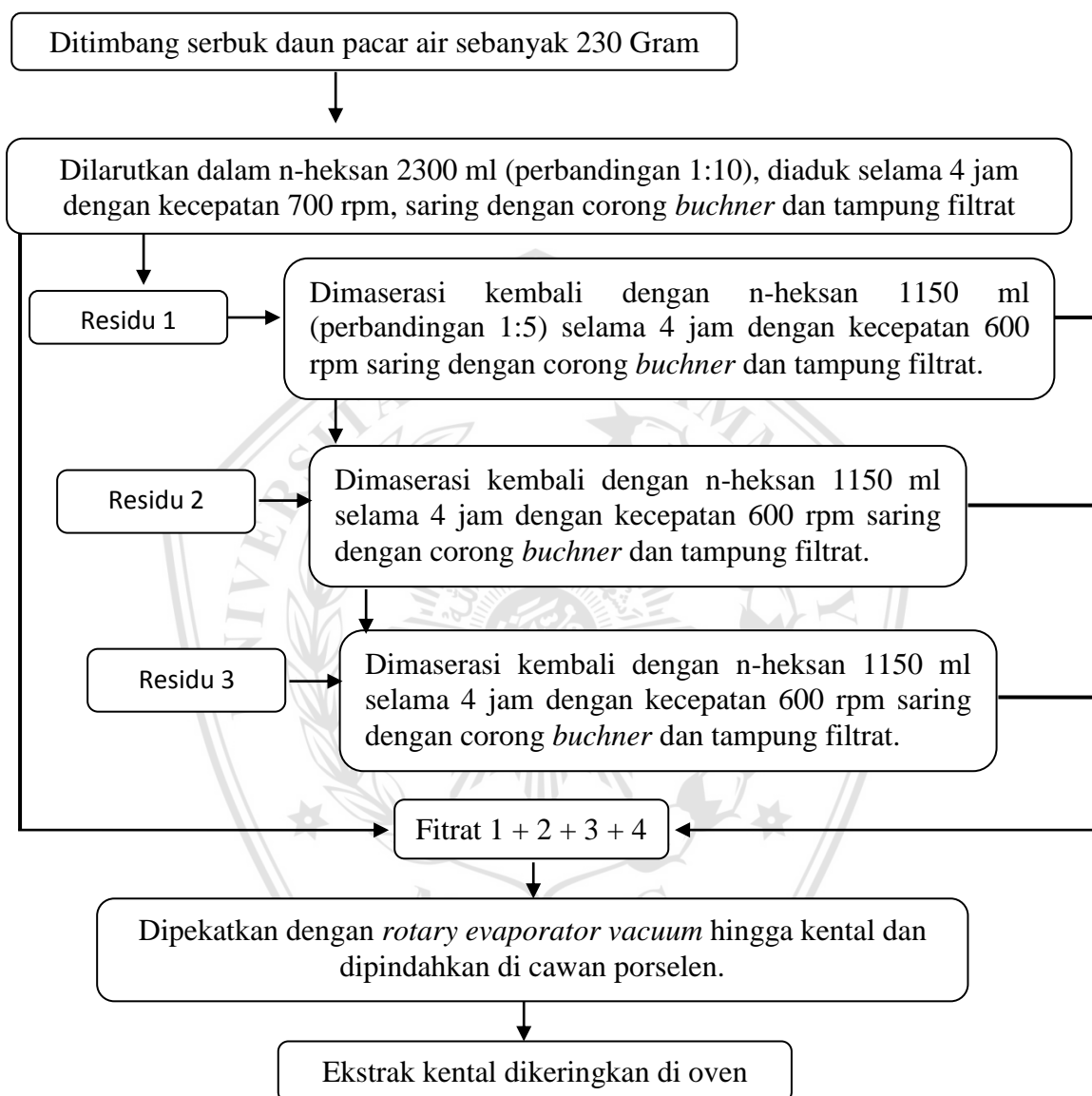
Sampel yang diteliti adalah daun bunga pacar air (*Impatiens balsamina L*). Bunga pacar air dicuci dengan air hingga bersih dan dipisahkan dari komponen lain selain bunga, kemudian diangin – anginkan pada suhu kamar selama  $\pm 30$  menit. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 40-50° C. Bagian bunga pacar air yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggilingan, sehingga diperoleh serbuk halus. Selanjutnya diayak menggunakan *Shieve Shaker* dengan derajat kehalusan tertentu (Farmakope Herbal Indonesia, 2009).

#### **4.6.3.2 Pembuatan Bahan Uji Fraksi N-Heksan**

Dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk bunga *Impatiens balsamina L* sebanyak 230 Gram dan diekstraksi dengan menggunakan maserasi kinetik sebagai berikut :

1. Timbang serbuk halus bunga *Impatiens balsamina L* sebanyak 230 Gram, masukkan ke dalam beaker glass.
2. Tambahkan n-heksan sebanyak 2300,0 ml (perbandingan 1:10), diaduk pada stirrer dengan kecepatan 700 rpm selama 4 jam kemudian saring dengan corong buchner dan tampung filtratnya.
3. Residu dimaserasi kembali dengan n-heksan sebanyak 1150,0 ml, (perbandingan 1:5) diaduk pada *stirrer* dengan kecepatan 600 rpm selama 4 jam. Saring dan tampung filtratnya. Proses maserasi ini dilakukan dengan metode yang sama secara berulang sampai pada filtrat tidak lagi menunjukkan ada komponen yang tertarik dengan pelarut n-heksan. Hal ini ditandai dengan tidak adanya noda yang terbentuk pada plat KLT.

4. Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* sampai diperoleh larutan ekstrak kental. Kemudian pindahkan ekstrak kental ke cawan porselen.
5. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C



**Bagan 4. 2. Proses Esktraksi Bunga *Impatiens balsamina L* dengan pelarut n-heksan.**

#### 4.6.3.3 Pemisahan Senyawa dengan KLT

Proses penelitian dengan penggunaan plat KLT dilakukan dua kali yakni untuk identifikasi senyawa metabolit sekunder dan juga untuk pengujian difusi cakram. Fraksi n-heksan bunga *I. balsamina L* ditimbang sebanyak 50 mg

dilarutkan dalam 1 ml n-heksan pada wadah tertutup rapat. Totolkan sebanyak 1 kapiler (5  $\mu$ l) pada lempeng KLT, kemudian diekspansi dengan berbagai macam fase gerak. Eluen yang memiliki kemampuan terbaik dalam memisahkan komponen senyawa, akan digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (Farmakope Herbal Indonesia, 2008).

Pemilihan eluen n-heksan dan etil asetat memiliki alasan bahwa kedua eluen tersebut cenderung stabil dan memiliki viskositas yang rendah, selain itu kombinasi eluen tersebut memberikan selektifitas yang memadai untuk campuran bahan yang akan dipisahkan, khususnya pada penelitian ini bersifat non polar. Eluen dipilih pada konsentrasi yang sesuai dengan sampel yang dipisahkan agar kromatografi dapat berjalan dengan baik. Pemilihan kombinasi eluen ditujukan agar tidak memberikan hasil yang bervariasi.

1. Fase diam : Silika Gel TLC 60 F<sub>254</sub>

2. Optimasi fase gerak :

- (1) Heksana : etil asetat = 9 : 1
- (2) Heksana : etil asetat = 8 : 2
- (3) Heksana : etil asetat = 7 : 3
- (4) Heksana : etil asetat = 6 : 4
- (5) Heksana : etil asetat = 5 : 5

#### 4.6.3.4 Identifikasi Komponen Senyawa

Terhadap komponen senyawa yang telah dipisahkan dengan metode KLT, dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak n-heksan *I. balsamina* L dengan penampak noda sebagai berikut:

- a. Alkaloid : Dragendorff
- b. Terpenoid : Anisaldehida-asam sulfat. Dipanaskan lempeng pada suhu 100° C selama 5-10 menit
- c. Flavonoid : Uap amonia atau asam sulfat 10%
- d. Polifenol : Besi (III) klorida 1%
- e. Antrakuinon : Larutan kalium hidroksida 10% dalam etanol

#### 4.6.3.5 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Pembuatan konsentrasi larutan uji dibuat dengan cara sebagai berikut:

- a. Timbang ekstrak n-heksan bunga *Impatiens balsamina* L sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 5 tetes Tween 80, tambahkan aquadest steril sampai 1 ml. Sehingga diperoleh larutan uji 50 mg/ml.
- b. Timbang ekstrak n-heksan bunga *Impatiens balsamina* L sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 5 tetes Tween 80, tambahkan aquadest steril sampai 1 ml. Sehingga diperoleh larutan uji 25 mg/ml.
- c. Timbang ekstrak n-heksan bunga *Impatiens balsamina* L sebanyak 12,5 mg dilarutkan dalam 5 tetes Tween 80, tambahkan aquadest steril sampai 1 ml. Sehingga diperoleh larutan uji 12,5 mg/ml.

#### 4.6.3.6 Preparasi Media

Dalam penelitian ini digunakan satu media yakni *Mueller Hinton Agar* (MHA) dalam pembuatan suspensi bakteri menggunakan aquadest steril dengan meremajakan bakteri sehari sebelum penggunaan. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan melarutkan bahan sebanyak 38 Gram (dengan komposisi : *Beef dehydrate infusion* 300 g/l, *Casein hydrolysate* 17.5 g/l, *Starch* 1.5 g/l dan *Agar* 15 g/l) kedalam 1 L aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 1 L. Erlenmeyer tersebut diletakkan diatas hot plate kemudian masukkan *magnetic stirrer* ke dalam erlenmeyer untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih. Setelah itu dimasukkan erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Dituang media steril ke cawan petri steril secara aseptis.

#### 4.6.3.7 Pembuatan Standar McFarland

Aquadest diambil kira-kira setengah dari tabung reaksi. Kemudian tambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebanyak 9,95 ml dan BaCl<sub>2</sub> 1% sebanyak 0,05 ml. Campur kedua larutan dalam tabung tersebut, dikocok sampai homogen dan terbentuk larutan keruh. Larutan ini merupakan standar McFarland 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri yang konsentrasinya 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml dan digunakan sebagai pembanding suspensi bakteri yang dibuat dalam preparasi bakteri.



Cat No.	McFarland Standard	1% BaCl <sub>2</sub> (mL)	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	Approximate Bacterial Suspension / mL
TM50	0.5	0.05	9.95	$1.5 \times 10^8$
TM51	1.0	0.10	9.90	$3.0 \times 10^8$
TM52	2.0	0.20	9.80	$6.0 \times 10^8$
TM53	3.0	0.3	9.7	$9.0 \times 10^8$
TM54	4.0	0.4	9.6	$1.2 \times 10^9$
TM55	5.0	0.5	9.5	$1.5 \times 10^9$
TM56	6.0	0.6	9.4	$1.8 \times 10^9$
TM57	7.0	0.7	9.3	$2.1 \times 10^9$
TM58	8.0	0.8	9.2	$2.4 \times 10^9$
TM59	9.0	0.9	9.1	$2.7 \times 10^9$
TM60	10.0	1.0	9.0	$3.0 \times 10^9$

**Tabel 4.1** Standar McFarland (Dalynn Biologicals, 2012)

#### 4.6.3.8 Preparasi Bakteri

Sebelum membuat suspensi bakteri, siapkan terlebih dahulu standar McFarland 0,5 yang setara dengan suspensi bakteri  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Proses peremajaan bakteri yang berasal dari biakan murni diambil 3-5 ose kemudian diinokulasikan pada Erlenmeyer yang berisi media *Nutrient Broth* sebanyak 50-100 ml. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kemudian lakukan pembuatan suspensi bakteri dengan teknik dilusi (pengenceran). Bakteri uji diambil dari hasil peremajaan menggunakan mikro pipet kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml aquadest steril (tabung A), dihomogenkan menggunakan *vortex* dan dibandingkan dengan standar McFarland 0,5 yang setara dengan sel bakteri dengan konsentrasi sebesar  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Jika sudah sama maka dilakukan pengenceran hingga didapatkan jumlah koloni bakteri yang diinginkan, yaitu  $10^6$  CFU/ml.

Pengenceran dilakukan dengan diambil 1 ml dari tabung A kemudian dilarutkan dengan Aquadest sampai 10 ml (tabung B) dengan jumlah koloni bakteri  $10^7$  CFU/ml, kemudian diambil 1 ml dari tabung B dilarutkan dengan

Aquadest sampai 10 ml (tabung C), diperoleh koloni bakteri  $10^6$  CFU/ml. Kemudian dari tabung C dilakukan penggoresan dengan teknik *Streak Plate* (Teknik Penggoresan Agar) yang diambil menggunakan kapas lidi steril, dan digoreskan secara kontinyu sampai setengah permukaan agar media MHA steril dengan 3-4 bagian secara horizontal, lalu putar cawan  $180^\circ$ . Lanjutkan goresan sampai habis. Setelah selesai, bakteri diinkubasi pada suhu  $37^\circ$  C selama 24 jam.

#### 4.6.4. Pengujian Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram

Proses pengujian antibakteri untuk metode difusi cakram, antara lain sebagai berikut:

- a. Disiapkan tabung berisi larutan uji masing-masing dengan konsentrasi 1,25 %, 2,5 % dan 5 %.
- b. Dilakukan peremajaan bakteri, cek bakteri (bakteri dapat aktif dan koloni) bakteri tidak lebih dari  $10^6$  CFU/ml. Dilakukan preparasi media.
- c. Bakteri yang telah di preparasi diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali, lalu diletakkan pada tepi tabung reaksi dan diputar agar bakteri yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Setelah itu di oleskan pada *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan diratakan.
- d. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah dioleskan bakteri *Escherichia coli* dibiarkan dahulu 5 menit supaya mengering.
- e. Dibuat larutan uji *I. balsamina* L sesuai konsentrasi yang ditentukan kemudian diambil dengan mikropipet dan diletakkan di atas kaca arloji. Kertas saring cakram kosong diletakkan di atas kaca arloji yang telah berisi larutan uji kemudian direndam selama 20 menit. Kertas saring cakram dipindahkan ke cawan petri dan dikeringkan dioven selama 5 menit.
- f. Kertas saring cakram yang telah berisi konsentrasi diletakkan diatas permukaan *Mueller Hinton Agar* (MHA) secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang menyala. Untuk diperoleh kontak yang baik *disk* kertas saring dapat ditekan dengan lembut menggunakan pinset pada permukaannya. Jarak diatur sedemikian rupa sehingga satu *disk* dengan *disk* yang lainnya berjauhan. Antibiotik kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif.

- g. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.
- h. Pengujian senyawa antibakteri dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya diameter zona (area) bening disekitar disk kertas saring. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan penggaris dalam satuan milimeter (mm).
- i. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

